

明細書

活性化リンパ球を同種補体を介して溶解させるヒトIgM抗体

5

技術分野

本発明は、活性化リンパ球の分化抗原に反応し活性化リンパ球を同種のヒト補体を介して溶解させるHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体とそれを含有する自己免疫病態の治療剤に関する。

10

背景技術

膠原病、自己免疫疾患、臓器移植拒否反応などにおける生体の免疫反応を制御するためにサイクロスボリン、FK506など種々の免疫抑制剤が開発されている。しかし、前記のような免疫抑制剤は免疫担当細胞以外にも働くため、副作用への配慮が必要である。

15

一方、標的とする細胞に特異的に反応する抗体を用いるために種々の検討が行われている。例えば、抗体が反応した標的細胞には補体が反応して細胞を溶解することが期待される。しかし、ヒトの細胞膜の上には、種特異的補体制御膜因子群 (DAF, Decay accelerating factor; MCP, Membrane cofactor protein; HRF20, 20kDa Homologous restriction factorなど) が存在し、同種のヒト補体の反応を防ぐために、補体反応を介した細胞溶解反応を起こさない。

20

一方、HIV感染細胞に反応するヒト血清中のIgM抗体は、HIV感染細胞を補体制御膜因子群に打ち勝ってヒト補体を介した細胞溶解反応起こせることを発見した。HIV感染により発現が高まるGM2やGg4などのガングリオシドに対するIgM抗体がそのような作用を発揮することを報告した(特開平9-227409)。

25

ガングリオシドのGM2に対するヒトIgMモノクローナル抗体としては、EBウイルスで不死化したヒトBリンパ芽球株が産生するL55が報告されており、このヒトIgMモノクローナル抗体を作らせたHIV感染細胞はヒト補体の反応を介して細胞溶解を起こすことがわかった。

発明の開示

本発明は、活性化リンパ球に特異的に反応し同種補体を介した細胞溶解を誘導するヒトIgMモノクローナル抗体を含有する免疫反応制御治療剤等を提供することにある。

上記課題を解決するために、銳意研究を重ねた結果、本発明は上記課題を解決する
5 ために、活性化ヒトリンパ球などを同種のヒト補体を介して溶解させることを特徴とするHIV感染細胞にも反応するヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

また、本発明は課題を解決するために、HIV感染細胞や活性化リンパ球に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を用いて、活性化リンパ球を溶解排除することにより、Tリンパ球の過剰反応に起因する移植拒絶反応や自己免疫病態を治療すると共にHIV
10 感染症も治療することを特徴とするHIV治療剤を提供する。

さらに、本発明は課題を解決するために、活性化リンパ球やHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体がH鎖の可変領域の核酸配列が配列番号1の核酸配列を有する9F11であることを特徴とする請求項1または2のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

15 さらに、本発明は課題を解決するために、活性化リンパ球やHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体のL鎖の可変領域の核酸配列が配列番号2の核酸配列を有する9F11抗体であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体を提供する。

20

図面の簡単な説明

図1は9F11抗体の特異性を示す図面である。

フローサイトメトリー法で解析した結果、非感染細胞は9F11抗体で染色されずHIV感染細胞が染色されていることを示す。

図2は9F11抗体の末梢血リンパ球への特異性を示す図面である。

25 9F11抗体は通常の末梢血リンパ球には反応しないが、PHA刺激で活性化したリンパ球には反応したことを示す。(PBMC: 末梢血リンパ球)

図3は9F11抗体による補体介在性細胞障害性反応を示す図面である。

(A) HIV-1感染細胞MOLT-4/IIIBに9F11抗体2 µg/mlと新鮮ヒト血清(補体成分含有)を添加後4時間でのほとんどの細胞が死滅している。また、血清を添加しなかった場

合や、非感染細胞MOLT-4 に対しては全く影響がなかったことを示す。

(B) PHAを用いて末梢血リンパ球を活性化すると9F11 抗原が誘導され、HIV-1感染細胞と同等に9F11抗体と補体による細胞障害を受けるようになることを示す。

(FHS: 新鮮ヒト血清（補体ソースとして使用） PHA: リンパ球活性化試薬

5 % ^{51}Cr release=死細胞率 PBMC:末梢血リンパ球)

図4は9F11 μ 鎖発現プラスミド構築模式図を示す。

発明を実施するための形態

以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施
10 例により何ら制限されるものではない。

本発明者らは、ヒトの免疫グロブリンに関する遺伝子を含む染色体を導入したキリ
ンピール社製のマウス (TCマウス : trans-chromosome mouse) にHIV感染細胞を免
疫して、HIV感染細胞に反応するヒト抗体を產生するマウスをえた。この免疫マウス
の脾細胞をマウス骨髄腫細胞株と融合させてハイブリドーマを定法に従って作成し、
15 そのハイブリドーマの中からHIV感染細胞に反応して、ヒト補体の存在下で感染細胞
を溶解させるモノクローナル抗体を產生するクローンを選び出した。そのハイブリド
ーマクローンを9F11細胞株と命名した。9F11細胞株が產生する抗体である9F11抗体は
ヒト μ 鎖とヒト κ 鎖からなるヒトIgMモノクローナル抗体であった。9F11抗体はHIV
感染細胞に反応してヒト補体を介して細胞溶解反応を起こしたが、非感染リンパ球で
20 もリンパ球が活性化したものに対しても同様な溶解反応を起した。したがって、HIV
感染細胞への反応はHIV感染によりある種の活性化状態になり、9F11に反応する抗原
(9F11抗原) が分化抗原として発現するためにHIV感染細胞もヒト補体を介して溶解
したと理解できた。すなわち9F11抗原はリンパ球が活性化したときに発現する分化抗
原であり、それに反応して補体を介した溶解反応を誘導する9F11抗体は活性化リンパ
25 球を特異的に補体を介して溶解する。そこで、9F11抗体を含有する治療剤が活性化リ
ンパ球を抑制する治療法に活用できることが明らかとなり、本発明を完成するに至った。
本発明9F11抗体を產生する細胞株9F11は、独立行政法人産業技術総合研究所 特
許生物寄託センター (茨城県つくば市東1-1-1 中央第6) に2003年5月8
日に国際寄託して、寄託番号F E R M B P - 8 3 7 9が付与された。

9F11抗体をコードする κ 鎖及び μ 鎖それぞれにおける可変領域の遺伝子の塩基配列についての解析結果は、表1に示すごとくである。定常領域については、既報の塩基配列とほぼ同様である。

(表1)

5

μ 鎖可変領域の塩基配列:

GCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGTCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTC
 TCCTTCCTCATCTTCCTGCCCGTGCTGGGCCTCCATGGGGTGTCTGTCAC
 AGGTACAGCTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCGCGCAGACCC
 10 TCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGAACAGTGCTAC
 TTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATTGAGAGGCCTTGAGTGGCTGGAAAG
 GACATACTACAGGTCCAAGTGGTATAATGATTATGCAGTATCTGTGAAAAGT
 CGAATAACCATCAACCCAGACACATCCAAGAACCAAGCTCCCTGCAGCTGA
 ACTCTGTGACTCCGAGGGACACGGCTGTATTACTGTGCAAGAGAGAATTA
 15 CTATGGTTGGGGAGGTACAACGGTACACTGGTCGACCCCTGGGCCAGGGAACCCCT
 GGTCACCGTCTCCTCA

κ 鎖可変領域の塩基配列:

TGTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCTCC
 20 TGCTGCTCTGGTCCCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC
 ATCTTCGGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTGTGGCG
 AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCTAACGCTCCTGATCTGATGCATCCAGTTGCAAAGTGGGTCCCCT
 CAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCACAGCAG
 25 CCTGCAGCCTGAAGATTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGGCTAACAGTTTC
 CCTCTCACTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

本発明の活性化リンパ球に特異的に反応し、同種補体を介した細胞溶解を誘導するヒトIgMモノクローナル抗体を含有する免疫反応制御治療剤等に利用するための組成

物は、生理学的なキャリアと組み合わせることによって得ることができる。生理学的に受容可能なキャリアは当該分野で周知であり、そして生理学的緩衝化食塩水もしくは他の緩衝作用を有する水溶液、又は溶媒、あるいはグリコール、グリセロール、油（例えば、オリーブ油）、又は注射可能な有機エステルのような溶剤を含む。生理学的に受容可能なキャリアはヒトIgM抗体を安定化させるか、吸収を増大させる化合物をも含む。このような生理学的に受容可能な化合物は、例えば、グルコース、スクロース、又はデキストラン等の糖類、アスコルビン酸、又はグルタチオン等の抗酸化剤、キレート剤、アルブミン等のタンパク質、あるいは他の安定化剤、又は賦形剤を含む。
5 また、サイクロスボリン、FK506など種々の免疫抑制剤等の他の免疫抑制剤を添加することも可能である。生理学的に受容可能なキャリアの選択は、投与経路、対象疾患によりそれぞれに組み合わせることができる。

実施例 1. 9F11抗体の特異性

被験細胞を $1 \times 10^6/ml$ の濃度に培養液中に浮遊し、これに $10 \mu g/ml$ の9F11抗体を等容量加えて30分間反応後、被験細胞を洗浄して、結合した9F11を蛍光標識した抗ヒトIgM抗体で染色し、これをフローサイトメトリーにかけて解析した。その結果、ヒト細胞株であるMOLT-4細胞、CEM細胞等は染色されないが、HIV-1のIIIB株やMN株等を感染させると強く染色され、9F11抗原がHIV感染により発現することがわかった（図1）。HIV感染はリンパ球活性化を誘導するので、正常人の末梢血液細胞のリンパ球にフィトヘモアグルチニン（PHA）を添加して3日間培養した活性化リンパ球などについても検討を行った。末梢血液細胞と未刺激の末梢血リンパ球では染色性は認められなかつたが、PHAで刺激した活性化Tリンパ球では強い染色性が認められ、9F11抗原は活性化Tリンパ球に発現してくる分化抗原であることが明らかとなった（図2）。

実施例 2. 9F11抗体による補体介在性細胞障害反応

被験細胞を予め放射性同位元素の ^{51}Cr で標識しておき、この標識被験細胞（ $5 \times 10^5/ml$ の濃度に培養液中に浮遊） $40 \mu l$ に、種々濃度の9F11抗体 $40 \mu l$ と $20 \mu l$ のヒト新鮮血清（補体血清）を加えてマイクロタイタープレート上にて4時間反応させた。反応後、プレートを遠心して細胞を沈下させ、細胞溶解によって上清中に放出された ^{51}Cr の放射能活性を、細胞溶解反応の指標として測定した。MOLT-4/IIIB (HIV-1を感染

したMOLT-4細胞)及び、PHAで活性化した末梢血由来リンパ芽球など、9F11抗原を発現している細胞は2 μ g/mlの9F11が存在すると補体を介した細胞溶解を起こした。これに対し、ヒト血清を56度Cで加熱しておいた非効化血清あるいはC9欠損ヒト新鮮血清を用いたときには細胞溶解は起こらない。このC9欠損ヒト新鮮血清に精製したC 5 9を添加すると細胞溶解が起こるようになるので、9F11による細胞溶解反応にはヒト補体反応が不可欠であった(図3)。

実施例3. 抗体の遺伝子工学的手法を用いた再構築の方法例

表1に示した9F11抗体可変領域の塩基配列をもとにすれば以下に示したshot-gun ligation method (Grundstrom, T. et al. Nucleic Acid Res. 13, 3305-3316 (1985)) 10 等の遺伝子工学的手法を用いて9F11抗体を産生する細胞株を樹立することができる。

表記の塩基配列を翻訳し、9F11抗体の可変領域のアミノ酸配列を得る。9F11抗体可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列はオリジナルの9F11抗体可変領域の塩基配列に加えてその使用コドンを変化させることにより、表2に示すように多種存在する。それらの中からオリゴヌクレオチドとして化学合成可能な適当な長さ毎に、 15 ある種の制限酵素認識断片を持つものを選び出した(表2)。

(表2) 9F11抗体のアミノ酸配列と同等のアミノ酸をコードするcDNAの一例

1

M S V S F L I F L P V L G L P W G V L S

ATA TCT GTT TCT TTT TTA ATT TTT TTA CCT GTT TTA GGT TTA CCT TGA GGT GTT TTA TCT

ATG TCC GTC TCC TTC TTG ATC TTC TTG CCC GTC TTG CCC TGG GGC GTC TTG TCC

TCA GTA TCA CTT CTT CCA GTC CTT GGA CTT CCA GGA GTA CTT TCA

TCG GTG TCG CTC CTC CCG GTG CTC GGG CTC CCG GGG GTG CTC TCG

AGT AGT CTA CTA CTA CTA CTA AGT

AGC AGC CTG CTG CTG CTG AGC

Q V Q L Q Q S G P G L V K P A Q T L S L

CAA GTT CAA TTA CAA CAA TCT GGT CCT GGT TTA GTT AAA CCT GCT CAA ACT TTA TCT TTA

CAG GTC CAG TTG CAG CAG TCC CCC GGC TTG GTC AAG CCG CCC GCC CAG ACC TTG TCC TTG

GTA	CTT	TCA GGA CCA GGA CTT GTA	CCA GCA	ACA CTT TCA CTT
GTG	CTC	TCG GGG CCG GGG CTC GTG	CCG GCG	ACG CTC TCG CTG
CTA	AGT	CTA	CTA AGT CTA	
CTG	AGC	CTG	CTG AGC CTG	

41

T C A I S G D S V S S N S A T W N W I R				
ACT TGT GCT ATT TCT GGT GAT TCT GGT TCT TCT AAT TCT GCT ACT TGA AAT TGA ATT CGT				
ACC TGC GCC ATC TCC GGC GAC TCC GTC TCC TCC AAC TCC ACC TGG AAC TGG ATC CGC				
ACA GCA TCA GGA TCA GTA TCA TCA TCA GCA ACA				
ACG GCG TCG GGG TCG GTG TCG TCG TCG GCG ACG				
	AGT	AGT AGT	AGT	
	AGC	AGC AGC	AGC	

61

Q S P L R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
CAA TCT CCT TTA CGT GGT TTA GAA TGA TTA GGT CGT ACT TAT CGT TCT AAA TGA TAT
CAG TCC CCC TTG CGC GGC TTG GAG TGG TTG GGC CGC ACC TAC TAC CGC TCC AAG TGG TAC
TCA CCA CTT CGA GGA CTT CTT GGA CGA ACA CGA TCA
TCG CCG CTC CGG GGG CTC CTC GGG CGG ACC CGG TCG
AGT CTA CTA AGT
AGC CTG CTG AGC

7 / 1

差替え用紙(規則26)

N D Y A V S V K S R I T I N P D T S K N

AAT GAT TAT GCT GTT TCT AAA TGT ATT ACT ATT AAT CCT GAT ACT TCT AAA AAT

AAC GAC TAC GCC GTC TCC GTC AAG TCC CGC ATC ACC AAC CCC GAC ACC TCC AAG AAC.

GCA GTA TCA GTA TCA CGA ACA CCA ACA TCA

GGG GTG TCG GTG TCG CGG ACG CCG ACG TCG

AGT AGT AGT

AGC AGC AGC

101

Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A

CAA TTT TCT TTA CAA TAA TGT TCT GAA GAT ACT GCT GTT TAT TAT TGT GCT

CAG TTC TCC TTG CAG TTG AAC TCC GTC ACC CCC GAG GAC ACC GCC GTC TAC TAC TGC GCC

TCA CTT CTT TCA GTA ACA CCA ACA GCA GTA GCA

TCG CTC CTC TCG GTG ACG CCG ACG GCG GTG GCG

AGT CTA CTA AGT

AGC CTG CTG AGC

121

R E N Y Y G S G R Y N W F D P W G Q G T
CGT GAA AAT TAT TAT GGT TCT GGT CGT TAT AAT TGA TTT GAT CCT TGA GGT CAA GGT ACT
CGC GAG AAC TAC TAC GGC TCC GGC CGC TAC AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGC ACC
CGA GGA TCA GGA CGA
CGG GGG TCG GGG CGG
CGG AGT
AGC

141

L V T V S S

TTA GTT ACT GTT TCT TCT

TTG GTC ACC GTC TCC TCC

CTT GTA ACA GTA TCA TCA

CTC GTG ACG GTG TCG TCG

CTA AGT AGT

CTG AGC AGC

制限酵素認識断片ごとに区切られた塩基配列を基にオリゴヌクレオチドを化学合成した。合成したオリゴヌクレオチドを順次それぞれの制限酵素で消化後、ライゲーションしていくことにより9F11抗体可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列全長を得た。H鎖、L鎖とも同様に得られた9F11抗体可変領域のcDNA断片（それぞれrV μ 9F11, rV κ 9F11）をキメラ抗体作成法と同様にヒトIgM抗体H鎖、L鎖の定常領域遺伝子配列（C μ , C κ ）を有するベクターに組み込みリコンビナント9F11 μ 鎖、 κ 鎖発現プラスミド（それぞれrV μ 9F11-C μ , rV κ 9F11-C κ ）を得た（図4）。

実施例4. リコンビナント抗体の発現
この再構成9F11抗体遺伝子発現プラスミドによって得られる抗体活性をCOS7細胞(ATCC CRL 1651)における一時発現系で検討した。これら2種のプラスミド(rV μ 9F11-C μ , rV κ 9F11-C κ)とヒトIgM抗体J鎖発現プラスミド(Cj)の混合物をGIBCO社製リポフェクトアミン試薬を用いプロトコールどおりに遺伝子導入した。その後通常培養条件下で2日間培養を続け遺伝子導入細胞の培養上清を回収した。培養上清を抗ヒト μ 抗体、抗ヒト κ 抗体を用いたサンドイッチELISAにかけ、培養上清中に存在するリコンビナント9F11抗体を確認した。またこの培養上清を用いてU937細胞、MOLT-4細胞およびU937細胞にHIV-1のIIIB株を感染させたU937/IIIB、MOLT-4/III Bなどを用いてFACS解析を行い同様の特異性を示す抗体であることを確認した。更に蛍光標識した基の9F11抗体とこの培養上清を同時にU937/IIIB、MOLT-4/IIIBに作用

させる競合阻害試験によりリコンビナント9F11抗体の活性を確認した。

したがって、表1に示された9F11抗体の μ 鎖、 κ 鎖可変領域の塩基配列がHIV感染細胞にも発現する活性化リンパ球分化抗原に対する抗体活性を担う極めて重要な領域であることが確認された。

- 5 この結果から、これらの μ 鎖可変領域の塩基配列、及び κ 鎖可変領域の塩基配列をコードする遺伝子はリコンビナント抗HIV抗体や抗活性化リンパ球抗体を作成するにあたり極めて有用な遺伝子であることが確認された。

産業上の利用可能性

- 10 活性化リンパ球に発現する分化抗原に対する本発明のヒトIgMモノクローナル抗体は、活性化リンパ球を補体反応を介して溶解する機能を発揮するので、体内で異常に活性化したリンパ球を制御する治療剤として活用することが出来る。また、リコンビナント抗活性化リンパ球抗体を作成するにあたり極めて有用な μ 鎖可変領域の塩基配列、及び κ 鎖可変領域の塩基配列をコードする遺伝子を提供する。

請 求 の 範 囲

1. 同種のヒト補体を介して溶解させることを特徴とする活性化ヒトリンパ球やHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体。
2. 活性化ヒトリンパ球に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を用いて、異常活性化リンパ球を溶解排除することにより、Tリンパ球の過剰反応に起因する移植拒絶反応や自己免疫病態の治療することを特徴とする免疫抑制剤及びHIV治療剤。
3. 活性化ヒトリンパ球やHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体がH鎖の可変領域の核酸配列が配列番号1の核酸配列を有する9F11であることを特徴とする請求項1または2のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体。
4. 活性化ヒトリンパ球やHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体のL鎖の可変領域の核酸配列が配列番号2の核酸配列を有する9F11抗体であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載のヒトIgMモノクローナル抗体。
5. 同種のヒト補体を介して溶解させることを特徴とする活性化ヒトリンパ球やHIV感染細胞に反応するヒトIgMモノクローナル抗体を產生する寄託番号がF E R M P B—8379である細胞株。
6. 寄託番号F E R M B P—8379である細胞株が產生することを特徴とする請求項1から請求項4のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

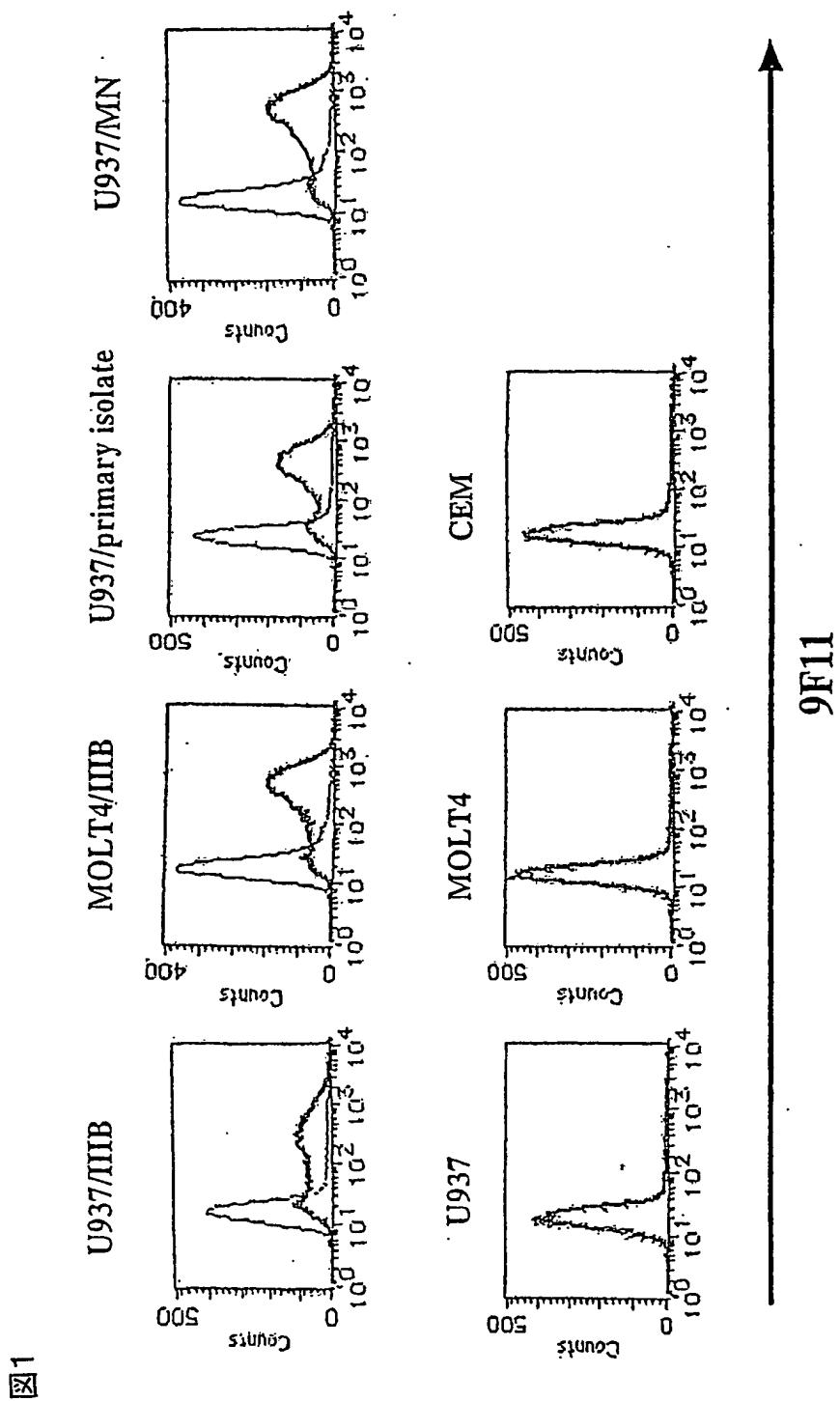


図1

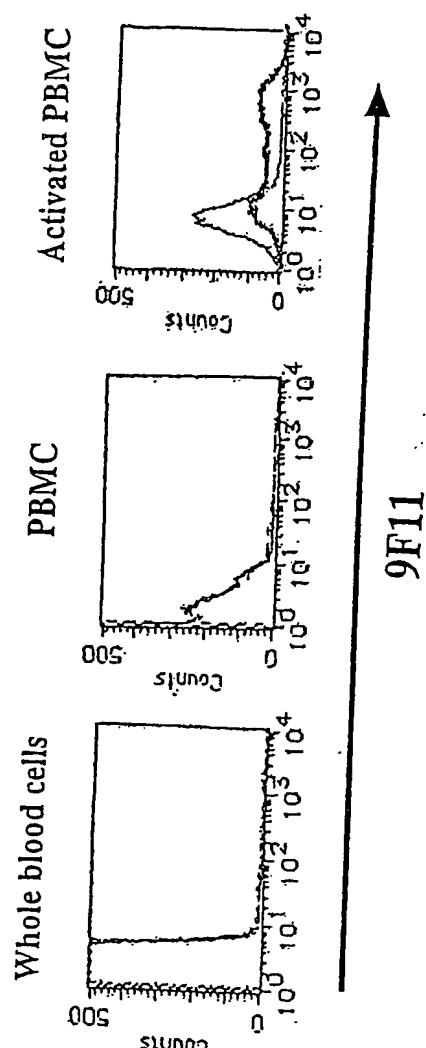
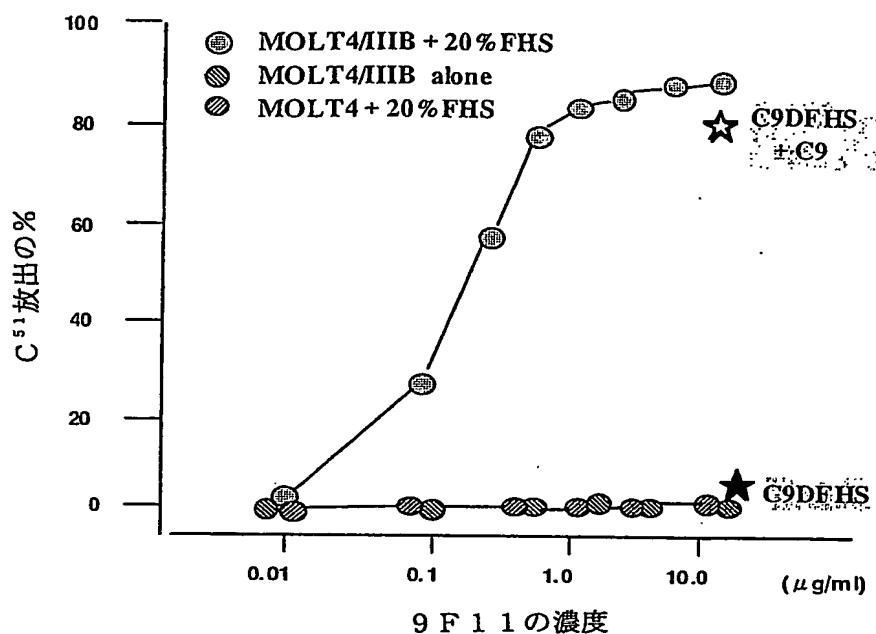


図2

図3

(A)



(B)

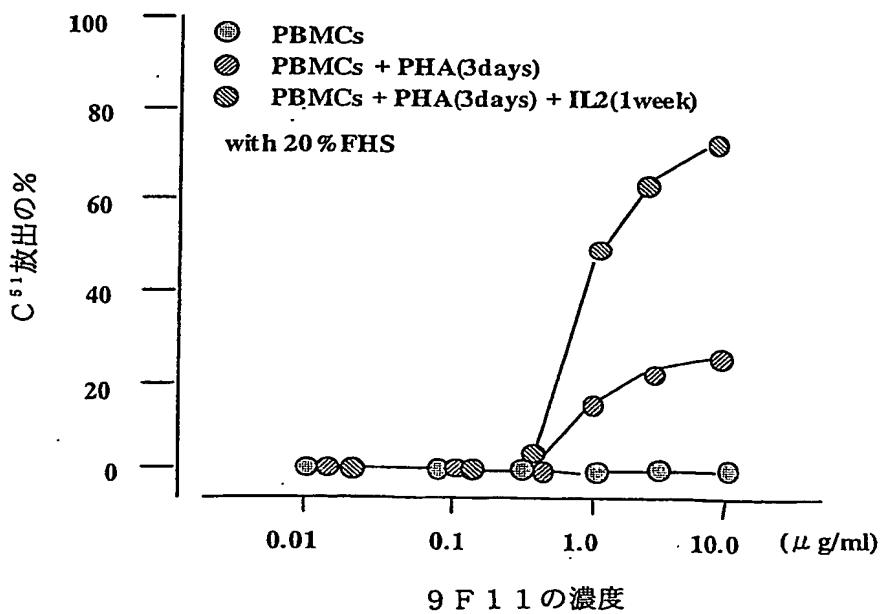
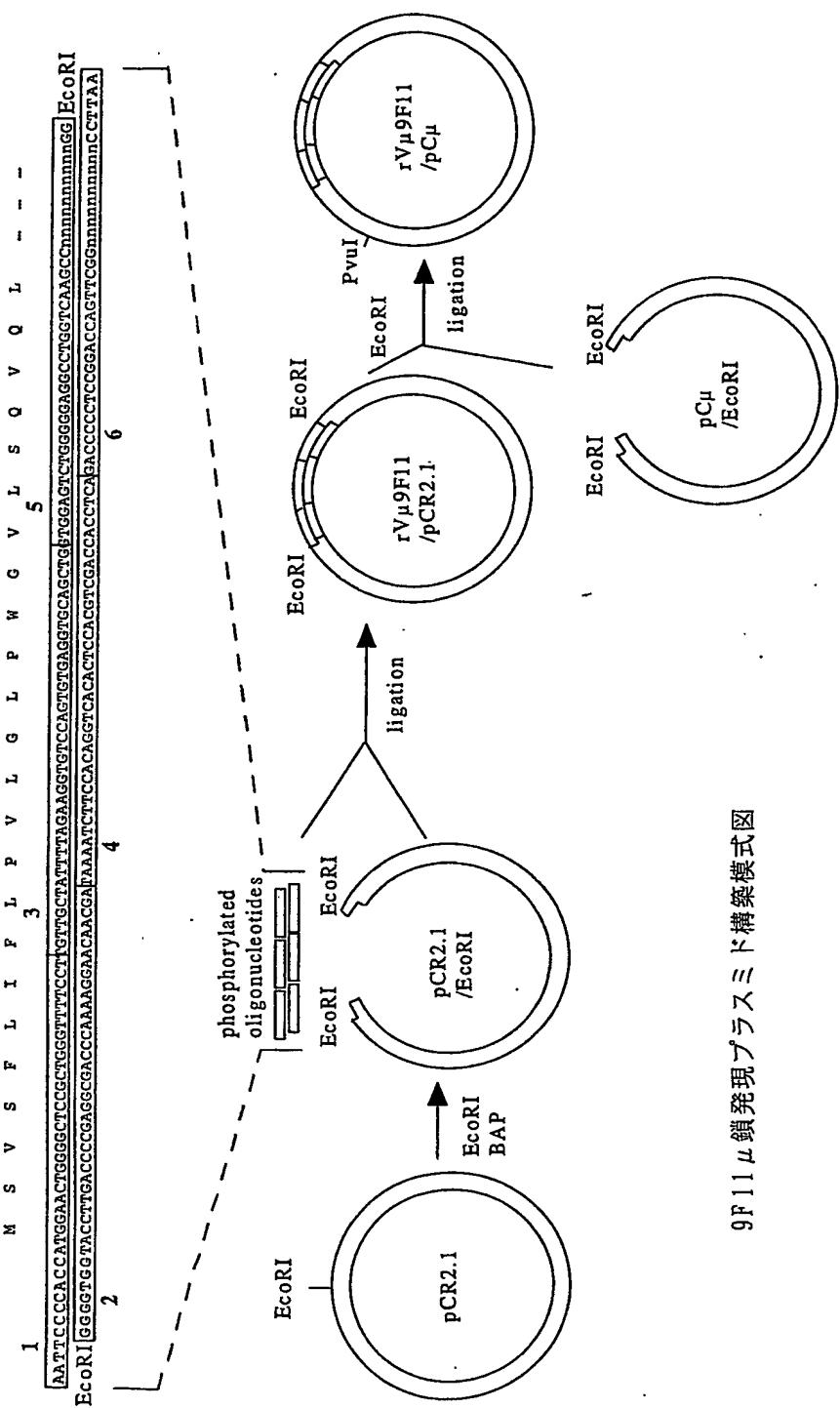


図4



9F11μ鎖発現プラスミド構築模式図